

На правах рукописи

ФАХРУЛЛИН РАВИЛЬ ФАРИДОВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-СОДЕРЖАЩЕЙ
НАНОПЛЕНКИ ДЛЯ ПЬЕЗОКВАРЦЕВЫХ БИОСЕНСОРОВ**

03.00.04 – Биохимия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2006

Работа выполнена на кафедре биохимии ГОУ ВПО "Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина"

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор Винтер Виктор Георгиевич

доктор биологических наук
Абрамова Зинаида Ивановна

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Жданов Ренат Ибрагимович
(лаборатория функциональной геномики и
липидомики НИИ патологии и патофизиологии
РАМН, г. Москва)

доктор биологических наук,
профессор Чиков Владимир Иванович
(лаборатория биохимии апопласта Казанского
института биохимии и биофизики КНЦ
РАН, г. Казань)

Ведущая организация: ФГУН «Казанский научно-
исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии» Роспотребнадзора (г. Казань)

Защита диссертации состоится 28 сентября 2006 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский государственный университет, аудитория № 209.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском государственном университете.

Автореферат разослан " ____ " августа 2006 г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Развитие биохимии в XXI веке определяется постоянным совершенствованием методов исследования. Результаты исследований в этой области активно внедряются в практику для разработки новых методов диагностики различных заболеваний (Jain, 2005).

Пристальное внимание исследователей привлекают антитела (АТ) к нативной ДНК, повышенный уровень которых является диагностическим признаком ряда аутоиммунных заболеваний (Hahn, 1998). Однако сложность заключается в том, что АТ к нативной ДНК постоянно присутствуют и в крови здоровых людей, уровень их содержания варьирует с изменением физиологического состояния организма. Применяемые в настоящее время для определения АТ к нативной ДНК методы радиоиммунного, флуоресцентного и иммуноферментного анализа длительны, трудоемки и не всегда позволяют достоверно дифференцировать норму от патологии.

Одним из новых подходов к детекции и изучению АТ к нативной ДНК является разработка пьезокварцевых биосенсоров, отличающихся высокой чувствительностью и экспрессностью (Luppa et al., 2001). Принцип действия пьезокварцевых биосенсоров основан на масс-чувствительности (нано-гравиметрии) пьезокварцевого резонатора, позволяющей фиксировать изменения массы на поверхности электродов в субнанограммовом диапазоне (Lu et al., 2004). Применение таких биосенсоров в проточно-инжекционном режиме дает возможность изучить процесс взаимодействия макромолекул *in situ* (Marxer et al., 2003).

На сегодняшний день описаны пьезокварцевые биосенсоры для ДНК-диагностики (Zhou et al., 2001) и определения некоторых ДНК-связывающих белков (Kim et al., 2002). Для формирования ДНК-содержащего рецепторного слоя подобных биосенсоров используется ковалентная иммобилизация одонитевых олигонуклеотидов (Mirsky, 2002).

В последние годы для конструирования тонких пленок биологических веществ используются процессы самосборки, когда биополимеры самопроизвольно формируют наноструктурированные пленки, избегая при этом денатурации макромолекул (Whitesides, Grzybowski, 2002). Формирование и структуру ДНК-содержащей нанопленки можно изучать методами наногравиметрического анализа и атомно-силовой микроскопии. Использование нанопленок в качестве биоселективных элементов сенсоров позволяет сохранить антигенные свойства нативной ДНК. Изучение процессов создания нанопленок представляет самостоятельный интерес для исследования многих аспектов взаимодействия биологических макромолекул. В связи с этим представляется весьма актуальной разработка и определение свойств ДНК-содержащей нанопленки для использования в качестве чувствительного элемента пьезокварцевых биосенсоров для определения АТ к нативной ДНК.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы было получение и характеристика свойств ДНК-содержащей нанопленки для создания рецепторного слоя пьезокварцевого биосенсора.

В работе были поставлены следующие задачи:

- исследовать сорбцию потенциальных слоев-предшественников (поли-L-лизин, фибронектин, спермин, спермидин и нафийон) на поверхности серебряных и золотых электродов пьезокварцевых резонаторов и их способность к связыванию нативной ДНК;
- определить оптимальные условия формирования поли-L-лизинового слоя-предшественника и ДНК-содержащей пленки;
- охарактеризовать кинетику формирования, стабильность, вязкостно-эластичные свойства и структуру поверхности ДНК-содержащей нанопленки;
- изучить возможность применения пьезокварцевого биосенсора на основе полученной ДНК-содержащей нанопленки для определения АТ к нативной ДНК в сыворотке крови.

Научная новизна.

Установлено, что поли-L-лизин может быть иммобилизован на поверхности серебряных и золотых электродов кварцевых резонаторов в процессе самосборки, без предварительной модификации металлической поверхности.

Впервые для изучения межмолекулярного взаимодействия ДНК и поли-L-лизина использован метод проточно-инжекционного наногравиметрического анализа с одновременным измерением частоты колебаний и реактивного сопротивления кварцевого резонатора. Показано, что характер связывания ДНК и иммобилизованного поли-L-лизина зависит от вторичной структуры полинуклеотида. Описана кинетика связывания ДНК с иммобилизованным поли-L-лизином, определены эластичные свойства ДНК-содержащей нанопленки. Методом атомно-силовой микроскопии получены изображения ДНК-содержащей нанопленки и определена структура ее поверхности.

Установлено, что полученная ДНК-содержащая нанопленка может быть использована в качестве распознающего элемента биосенсоров для определения АТ к нативной ДНК.

Практическая значимость.

Разработанный способ поэтапной иммобилизации поли-L-лизина и нативной ДНК на серебряных и золотых электродах кварцевых резонаторов может быть использован при конструировании других типов биосенсоров или ДНК-содержащих покрытий.

Представленный в работе протокол применения пьезокварцевого биосенсора на основе ДНК-содержащей нанопленки может быть использован для экспресс-анализа АТ к нативной ДНК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ формирования на металлических поверхностях наноструктурированной эластичной ДНК-содержащей нанопленки.
2. Использование полученной ДНК-содержащей нанопленки в качестве чувствительного элемента пьезокварцевых биосенсоров для определения АТ к нативной ДНК в биологических жидкостях.

Апробация работы.

Основные результаты исследований докладывались на ежегодных итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2004-2006 гг.), на Международной научной конференции «Новая Геометрия Природы» (Казань, 2003), Всероссийской конференции "Новые биокрибернетические и телемедицинские технологии XXI века для диагностики и лечения заболеваний человека" (Петрозаводск, 2003), Всероссийской конференции по аналитической химии "Аналитика России - 2004" (Москва, 2004), научно-практической конференции "Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии" (Казань, 2004), VI - VIII Международных научных молодежных школах "Когерентная оптика и оптическая спектроскопия" (Казань, 2002-2004), VI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2006), 10-ой Школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пушино, 2006), XIII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем (Яльчик, Республика Марий Эл, 2006).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ.

Благодарности.

Автор посвящает работу светлой памяти научного руководителя профессора В.Г. Винтера, организатора исследований по созданию пьезокварцевых биосенсоров в Казанском государственном университете.

Автор выражает глубокую признательность и искреннюю благодарность за поддержку, консультации и помощь в работе научному руководителю д.б.н. З.И. Абрамовой; проф., д.б.н. Д.Г. Ишмухаметовой; проф., д.м.н. Л.И. Анчиковой; доц., к.ф-м.н. О.А. Коноваловой; инженеру каф. биохимии В.С. Гаврилову; доц., к.б.н. В.И. Гаранину; проф., д.б.н. А.И. Голубеву; доц., к.ф-м.н. К.Ю. Нагулину; доц., к.б.н. Р.М. Сабирову и проф., д.ф-м.н. М.Х. Салахову; а также всему коллективу кафедры биохимии КГУ.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 170 страницах машинописного текста, включает 52 рисунка и 6 таблиц. Список использованных библиографических источников включает 262 источника, из них 245 - иностранные работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования

В работе использовали коммерческие препараты поли-L-лизина (Sigma) и ДНК эритроцитов цыплят (Reanal). Сыворотки крови больных бронхиальной астмой и здоровых доноров любезно предоставлены Республиканской клинической больницей РТ, сыворотки крови больных системной красной волчанкой (СКВ) и очищенные АТ к ДНК - проф. Д.Г. Ишмухаметовой.

Методы исследования

Наногравиметрический анализ

Кварцевые микровесы для работы в газовом режиме были изготовлены на кафедре общей физики КГУ доц. К.Ю. Нагулиным. Для жидкостного анализа использовали кварцевые микровесы QCM 200 фирмы Stanford Research Systems (SRS, США). Схема экспериментальных установок изображена на рис. 1.

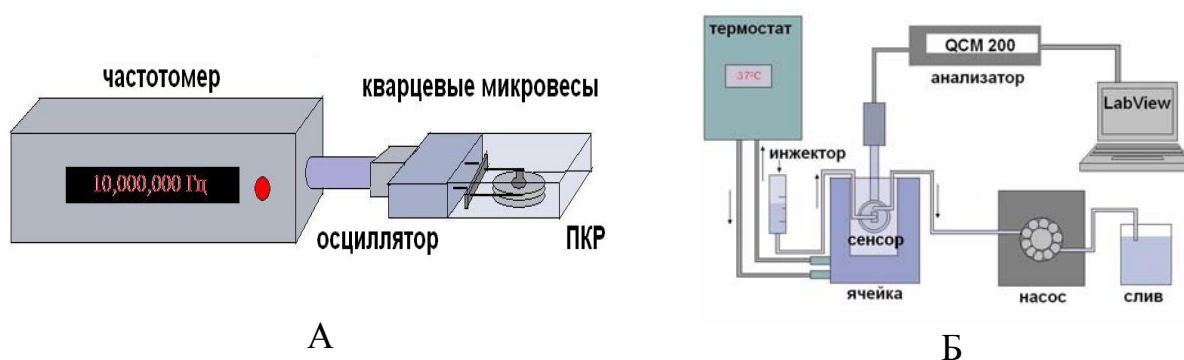


Рис. 1. Экспериментальная установка для проведения наногравиметрического анализа: А – в газовом режиме; Б – в жидкостном режиме

Анализ осуществляли в газовом и жидкостном (проточно-инжекционном) режимах. Серебряные электроды пьезокварцевых резонаторов (ПКР) для газового анализа механически шлифовали порошком Al_2O_3 , затем отмывали в растворе, содержащем равные объемы 1М NaOH и 33% H_2O_2 , ополаскивали 96% этанолом и водой. Золотые электроды ПКР для газового анализа отмывали в растворе, содержащем равные объемы 1М NaOH и 33% H_2O_2 , ополаскивали 96% этанолом и водой. Предварительную очистку золотых электродов ПКР фирмы SRS осуществляли обработкой ультрафиолетом (134-340 нм) на расстоянии 10 см от источника, затем последовательно выдерживали в 1 М NaOH, 1 М HCl и повторяли обработку ультрафиолетом. В промежутках ПКР ополаскивали деионизованной водой.

Нанесение и оценку эффективности иммобилизации биологических слоев на поверхности электрода ПКР осуществляли методом анализа в газовом режиме. На электрод наносили определенный объем раствора исследуемого вещества и инкубировали в насыщенной водяными парами камере.

После инкубации жидкость удаляли с электрода, отмывали на магнитной мешалке и высушивали в сушильном шкафу при $+37^{\circ}\text{C}$. Сорбцию оценивали по разности резонансной частоты колебаний ПКР (по модулю) до и после инкубации.

В проточно-инжекционном режиме ячейку, содержащую резонатор, помещали в термостат ($+37^{\circ}\text{C}$), затем фиксированный объем жидкости вводили в стеклянный инжектор и пропускали через проточную ячейку при помощи перистальтического насоса со скоростью 80 мкл/мин. Присоединение веществ к поверхности электрода определяли по изменению резонансной частоты (ΔF) и реактивного сопротивления (ΔR) электрода ПКР в реальном времени, с интервалом в 1 с.

Формирование и изучение свойств ДНК-содержащей нанопленки

Для изучения взаимодействия поли-L-лизина и ДНК *in situ* резонатор помещали в проточную ячейку, пропускали через нее буфер до стабилизации сигнала, вносили в ячейку раствор нативной (нДНК) или денатурированной ДНК (дДНК) (50 мкг/мл), затем пропускали через ячейку буфер для удаления неприсоединившихся молекул ДНК. В качестве контроля использовали сорбцию ДНК на золотой электрод, не обработанный поли-L-лизином.

Применение ДНК-содержащей нанопленки в качестве чувствительного элемента пьезокварцевого биосенсора

Для оценки чувствительности пьезокварцевого биосенсора с рецепторным слоем из ДНК-содержащей нанопленки использовали образцы сывороток крови, содержащие АТ к нДНК (сыворотки крови больных СКВ, бронхиальной астмой), а также растворы, содержащие известные концентрации очищенных препаратов АТ к нативной ДНК. В качестве контроля использовали сыворотки крови здоровых доноров, а также растворы моноклональных АТ к IgE человека, АТ к денатурированной ДНК и ДНКазы I. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически ($\lambda=280$ нм). Содержание АТ к нативной ДНК в используемых образцах предварительно определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Сатарова и др., 1994). Для предотвращения неспецифической сорбции электроды ПКР, модифицированные ДНК-содержащей нанопленкой, предварительно обрабатывали раствором бычьего сывороточного альбумина (1% раствор в фосфатно-солевом буфере).

Сыворотки крови разводили в фосфатно-солевом буфере с твином до концентрации белка, равной 0,1 мг/мл. При анализе в газовом режиме на электрод наносили 40 мкл сыворотки, инкубировали в течение часа во влажной камере, затем отмывали последовательно в буфере, воде, высушивали и определяли сдвиг частоты.

При проточно-инжекционном анализе через проточную ячейку с установленным ПКР пропускали определенный объем раствора очищенных АТ

или разведенной сыворотки, затем отмывали фиксированным объемом буфера. Присоединение АТ к ДНК-содержащей нанопленки оценивали по изменению резонансной частоты и реактивного сопротивления биосенсора в реальном времени, с интервалом в 1 с.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

При изучении поэтапного формирования нанопленки 100 мкл раствора поли-L-лизина (0,1 мг/мл) в 0,05 М NaOH-глициновом буфере (pH 10,6) наносили на электрод, инкубировали в течение 60 мин при +37°C, отмывали в воде и высушивали, после чего изучали поверхность методом АСМ. Затем 100 мкл раствора ДНК (50 мкг/мл) в 0,05 М Tris-HCl буфере (pH 7,2), содержащем 0,15 М NaCl и 0,001 М ЭДТА, наносили на электрод и инкубировали в течение часа, затем отмывали в воде и высушивали, после чего изучали поверхность методом АСМ.

Изучение поверхностной структуры электродов и ДНК-содержащей нанопленки проводили в полуконтактном режиме на воздухе при комнатной температуре на атомно-силовом микроскопе Solver P47H (ЗАО «НТ-МДТ», РФ), сканер - 50 мкм, со сканирующей головкой «Смена Б». Использовали кремниевые кантилеверы (радиус кривизны острия - менее 10 нм, резонансная частота колебаний зонда - 190-225 кГц). Сканирование проводили с разрешением 1024×1024 точек.

Оценка результатов и статистическая обработка

Определение изменения поверхностной массы при газовом анализе осуществляли с использованием уравнения Зауэрбрея (Sauerbrey, 1959). Регистрацию и первичную обработку экспериментальных данных кварцевых микровесов QCM 200 осуществляли при помощи программы Lab View 1.0. Вязкостно-эластичные свойства пленки ДНК-содержащей пленки определяли, используя отношения экспериментальных значений сдвига резонансной частоты и реактивного сопротивления ($\Delta R/\Delta F$) (Xie et al., 2003). Кинетику взаимодействия поли-L-лизина и ДНК описывали с помощью функции нелинейного приближения программы Prizm 4. Для сравнения выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Акберова, 2004). Полученные результаты обрабатывали при помощи программы SigmaStat 9.0. Обработку изображений сканированных объектов производили с помощью программного обеспечения «Nova» RC 1.0.26.578 для зондовых микроскопов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение сорбции слоя-предшественника для иммобилизации ДНК

В предварительных экспериментах было установлено, что ДНК при иммобилизации на золотых электродах не может быть закреплена на метал-

лической поверхности непосредственно. В связи с этим было необходимо использовать какой-либо слой-предшественник для иммобилизации ДНК. В качестве возможных слоев-предшественников были выбраны ДНК-связывающие полипептиды - поли-L-лизин и фибронектин, полиамины - спермин и спермидин, а также нафион (перфторсульфонатный полимер, обладающий нанокластерной структурой и формирующий однородные пленки на поверхности металлов). На рис. 2-А показано изменение частоты колебаний ПКР в зависимости от сорбции исследуемых веществ на поверхности электрода.

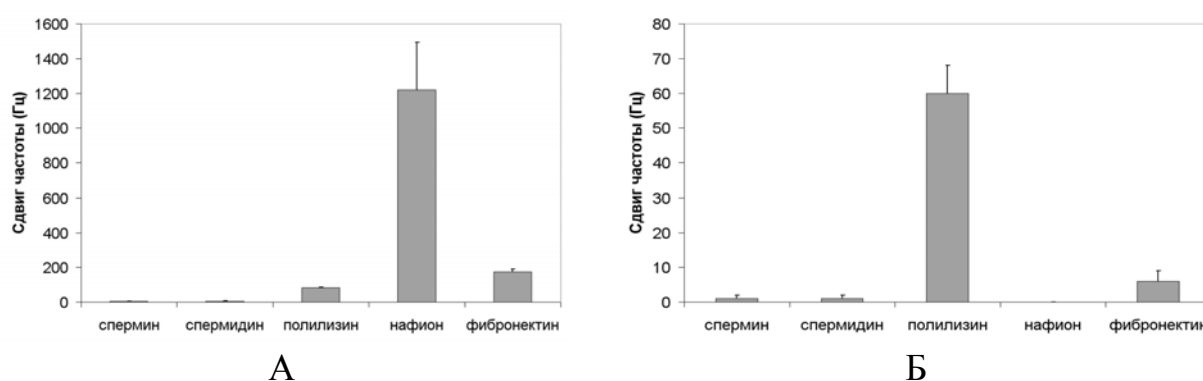


Рис. 2. А – сорбция слоя-предшественника на поверхности электрода ПКР; Б – присоединение ДНК к слою-предшественнику

Спермин и спермидин не связываются с металлической поверхностью и удаляются при отмывке. Это может быть обусловлено небольшим размером молекул (молекулярная масса спермина и спермидина равна 348,2 Да и 254,63 Да соответственно). Поли-L-лизин, нафион и фибронектин образовывали пленки на поверхности электродов: сдвиг частоты при иммобилизации составляет 84 ± 2 Гц, 1218 ± 275 Гц и 175 ± 15 Гц соответственно. Далее было установлено, какое из данных веществ в иммобилизованном состоянии обладает способностью к связыванию ДНК. Результаты исследования показаны на рис. 2-Б. Наибольший сдвиг частоты (60 ± 8 Гц) обусловлен присоединением ДНК к иммобилизованному поли-L-лизину. Фибронектин также связывает ДНК, однако значительно менее эффективно. Нафион не связывает ДНК, что объясняется отрицательным поверхностным зарядом нафионовой пленки, отталкивающей отрицательно заряженную ДНК (Jang et al., 2004). Исходя из этого, в качестве слоя-предшественника для иммобилизации ДНК выбран высокомолекулярный полипептид поли-L-лизин.

Для определения оптимальных условий формирования поли-L-лизинового слоя-предшественника на металлическом электроде было изучено влияние таких факторов, как pH, температура, время инкубации и концентрация поли-L-лизина в растворе. Результаты представлены на рис. 3.

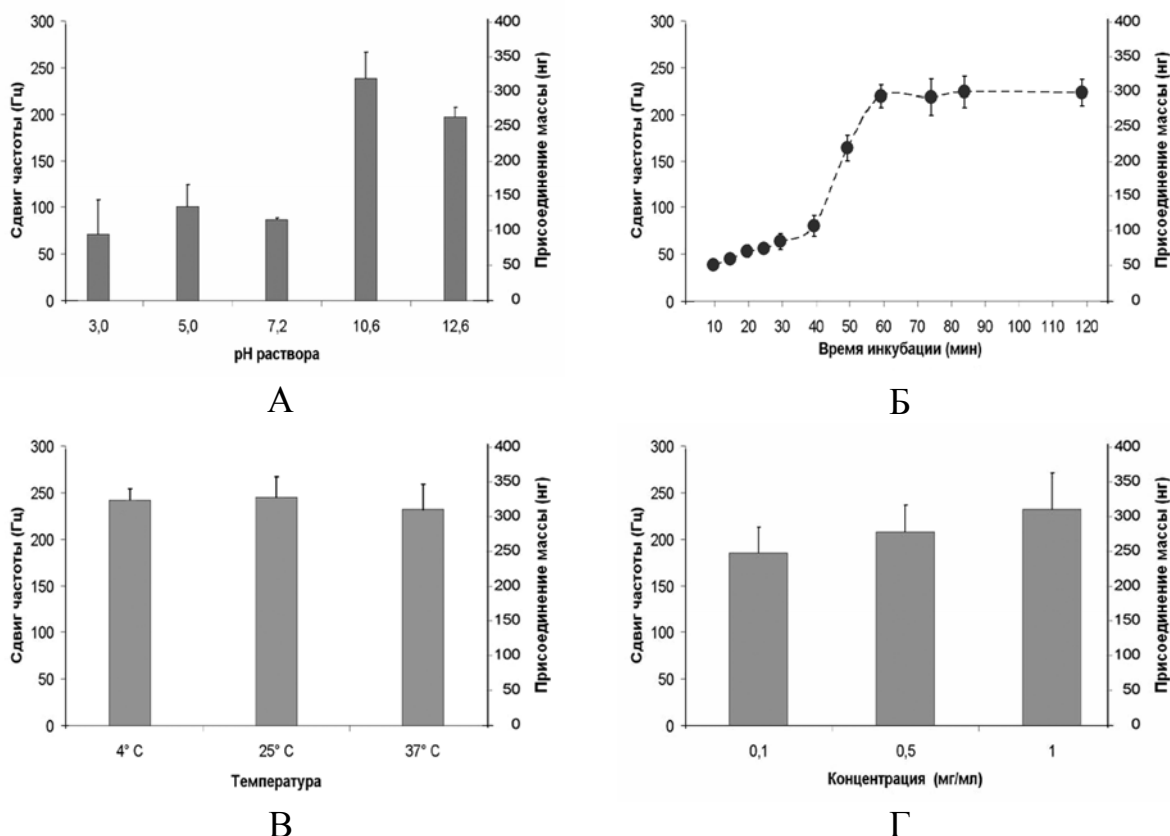


Рис. 3. Влияние на сорбцию поли-L-лизина на поверхности электрода кварцевого резонатора: А – pH буфера; Б – времени инкубации; В – температуры инкубации; Г – концентрации поли-L-лизина в растворе

В частности, установлено, что наиболее эффективно поли-L-лизин сорбируется из NaOH-глицинового буфера (pH 10,6). Это может быть связано с тем, что при иммобилизации α -спиральных молекул поли-L-лизина наиболее вероятна компактная укладка полипептида на поверхности электрода. При кислых значениях pH (3,0 и 5,0) поли-L-лизин обладает неупорядоченной структурой, которая из-за электростатического отталкивания $-\text{NH}_2$ групп недостаточно прочно присоединяется к поверхности металла и удаляется в процессе отмывки, о чем свидетельствует меньший сдвиг частоты (рис. 3-А).

Также было показано, что пленка поли-L-лизина формируется на поверхности электрода в течение первых 60 мин, дальнейшая инкубация не вызывает значительного сдвига частоты (рис. 3-Б).

Важным аспектом при разработке биосенсора является определение оптимальной температуры формирования биорецепторной пленки. Как показано на рис. 3-В, присоединение поли-L-лизина к электроду не зависит от температуры в пределах от +4°C до +37°C. Результаты можно объяснить тем, что при щелочных значениях pH в диапазоне температур от 0 до +38°C поли-L-лизин находится в α -спиральном состоянии. Изучение сорбции поли-L-лизина при температурах выше +40°C не проводили, так как известно,

что при температурах выше $+40^{\circ}\text{C}$ данный полипептид приобретает β -структуру (Rodriguez-Maldonado et al., 2005). β -слой поли-L-лизина, иммобилизованный на электроде биосенсора, из-за пространственного несоответствия участков взаимного присоединения данных макромолекул (Niwa et al., 2002), связывает ДНК гораздо менее эффективно, чем α -спиральная структура.

Таким образом, формирование слоя-предшественника происходит одинаково эффективно как в холодильной камере ($+4^{\circ}\text{C}$), так и при комнатной температуре ($+25^{\circ}\text{C}$) или в термостате ($+37^{\circ}\text{C}$), что упрощает технологию получения пленки.

Кроме того, как показано на рис. 3-Г, увеличение концентрации поли-L-лизина в инкубационном растворе вызывает лишь незначительное увеличение сдвига частоты, что позволяет использовать малые концентрации поли-L-лизина (0,1 мг/мл).

В настоящее время для разработки пьезокварцевых биосенсоров наиболее часто используют ПКР с золотыми или серебряными электродами. Нами была установлена зависимость сорбции поли-L-лизина от материала электрода. Результаты представлены на рис. 4.

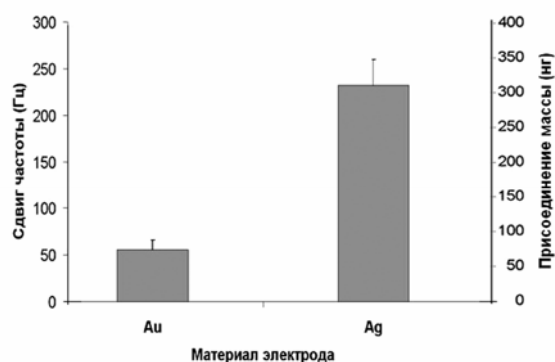


Рис. 4. Зависимость сорбции поли-L-лизина от материала электродов ПКР

Пьезокварцевые резонаторы с серебряными электродами относительно дешевы и доступны, но предназначены для работы в герметично закрытом корпусе с инертной атмосферой. Для создания биосенсоров резонатор необходимо освободить от корпуса, что способствует образованию оксидной пленки на поверхности серебряных электродов. Это отрицательно влияет на иммобилизацию биологических макромолекул.

Для удаления оксидной пленки серебряные электроды шлифуют абразивным материалом. Эффективность сорбции поли-L-лизина на шлифованной поверхности серебряного электрода значительно возрастает, однако структура поверхности обуславливает неоднородную толщину слоя, что может вызвать десорбцию последующих слоев во время отмывок. Для изучения топографии электродов нами использован метод атомно-силовой микроскопии, позволяющий изучить шероховатость исследуемой поверхности. АСМ-изображения электродов показаны на рис. 5.

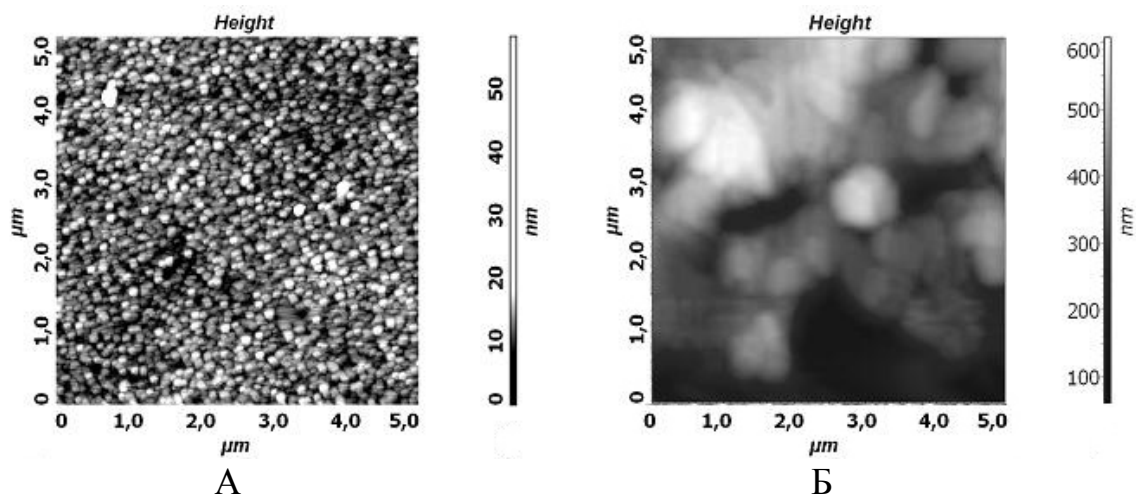


Рис. 5. Поверхности электродов кварцевых резонаторов: А- золотой электрод; Б - серебряный электрод

Шлифованная поверхность серебряных электродов обладает развитой поверхностной структурой со средним параметром шероховатости $R_q=146$ нм. Эффективная площадь такого электрода изменяется при каждой обработке абразивом, поэтому невозможно обеспечить воспроизводимую иммобилизацию поли-L-лизина. Кроме того, при использовании шлифованных серебряных электродов в жидкой среде происходит неконтролируемое внедрение жидкости в полости поверхности электрода, что также отрицательно сказывается на стабильности и воспроизводимости анализа.

Резонаторы с золотыми электродами, напыленными на полированную поверхность кварцевого кристалла, лишены этих недостатков (Marx, 2003). Нами установлено, что средний параметр шероховатости золотых электродов $R_q=3$ нм. Золотое покрытие электрода отличается химической и механической стабильностью. Кроме того, полированная поверхность делает возможным равномерное распределение молекул, что обеспечивает воспроизводимые результаты измерений. В связи с этим для дальнейшего изучения иммобилизации ДНК и иммуноанализа использовали резонаторы с золотыми электродами.

Формирование и изучение свойств ДНК-содержащей пленки

Определение оптимальных условий иммобилизации ДНК на поверхности золотого электрода, модифицированного поли-L-лизином, проводили в газовом режиме. Результаты показаны на рис. 6.

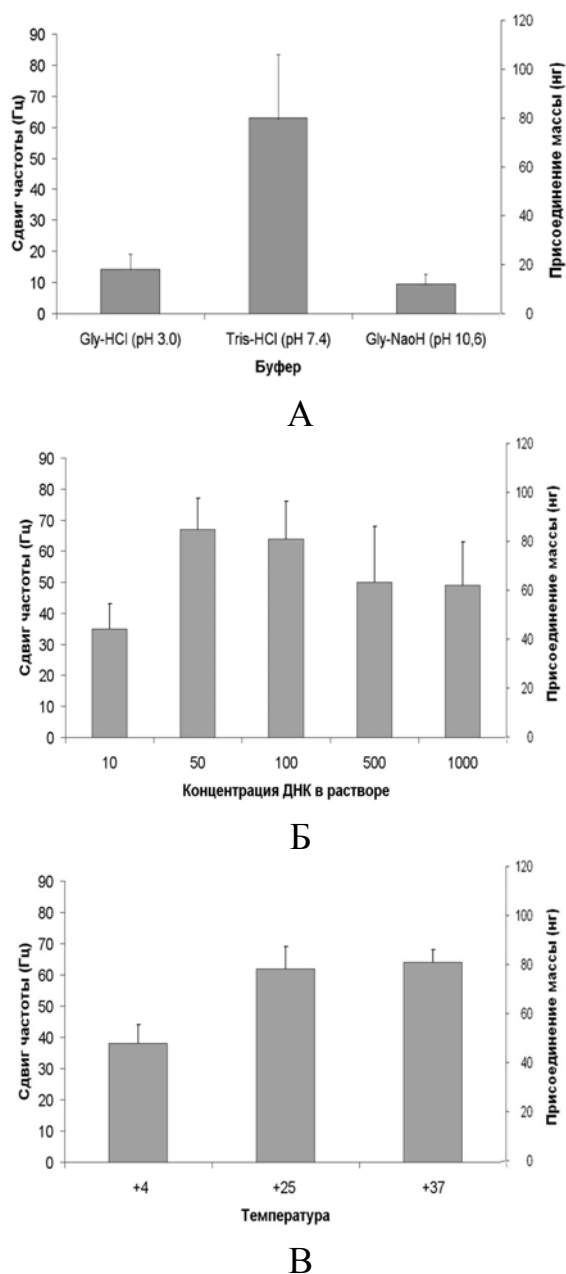


Рис. 6. Зависимость присоединения нативной ДНК к электроду, модифицированному поли-L-лизином, от: А – pH и состава буфера; Б – концентрации ДНК (мкг/мл); В – температуры инкубации (°C)

В кислой среде (pH 3,0) молекула ДНК не несет суммарного отрицательного заряда, что препятствует ее связыванию с поли-L-лизином. При pH 10,6 аминогруппы поли-L-лизина находятся в незаряженном состоянии, соответственно, они не могут участвовать во взаимодействии с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. В нейтральной среде (pH 7,4) ДНК заряжена отрицательно, а поли-L-лизин – положительно, что обуславливает эффективное присоединение ДНК к слою предшественнику (рис. 6-А).

Оптимальной концентрацией ДНК для формирования ДНК-содержащей пленки является концентрация 50 – 100 мкг/мл (рис. 6-Б). При более высоких концентрациях ДНК (500 – 1000 мкг/мл), по-видимому, происходит взаимное экранирование фосфатных групп полинуклеотида, что затрудняет взаимодействие с поли-L-лизином.

ДНК связывается с поли-L-лизином одинаково эффективно при +25°C и +37°C, тогда как при инкубации на холоду наблюдается значительно меньшее присоединение ДНК (рис. 6-В).

На основании полученных результатов, в дальнейшем, для формирования ДНК-содержащей пленки использовали растворы ДНК с концентрацией 50 мкг/мл в 0,05 M Tris-HCl буфере (pH 7,2), инкубацию проводили при + 37°C.

Следующим этапом характеристики ДНК-содержащей пленки было изучение динамики ее формирования в проточно-инжекционном режиме. Для этого использовали кварцевые микровесы QCM 200. Одновременное измерение резонансной частоты и реактивного сопротивления с их помо-

щью позволяет не только оценить присоединение массы, но и определить вязкостно-эластичные свойства тонких пленок.

На рис. 7 показано изменение сигнала ПКР, на электрод которого нанесен поли-L-лизин, при пропускании через проточную ячейку нативной и денатурированной ДНК. В качестве контроля использовали не модифицированный поли-L-лизином электрод. ДНК не связывается с чистой золотой поверхностью, о чем свидетельствует нулевой сдвиг частоты и реактивного сопротивления.

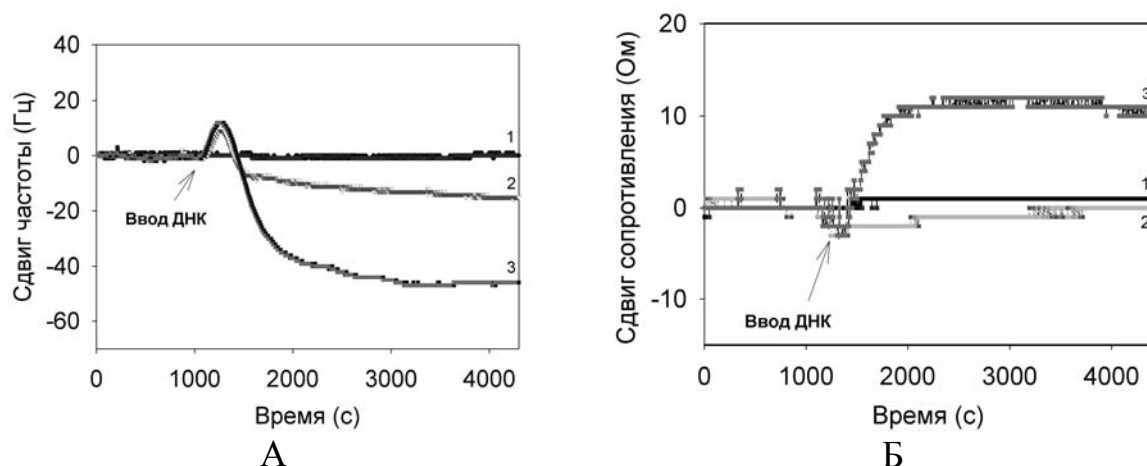


Рис. 7. Изменение: А - частоты колебаний; Б – реактивного сопротивления ПКР, модифицированного поли-L-лизином, при взаимодействии с нативной (3) и денатурированной ДНК (2). Контроль (1) – электрод, не модифицированный поли-L-лизином

Характер взаимодействия полипептида с нативной и денатурированной ДНК существенно отличается. Присоединение нативной ДНК к поли-L-лизину обуславливает сдвиг частоты 60 ± 12 Гц, денатурированной - 21 ± 3 Гц. Изменение реактивного сопротивления также свидетельствует о различиях в механизме присоединения нативной и денатурированной ДНК к поли-L-лизину. Связывание нативной ДНК обуславливает сдвиг сопротивления 11 ± 1 Ом, тогда как значение сдвига сопротивления при связывании денатурированной ДНК находится в пределах ± 1 Ом. Нами определено время насыщения (26,5 мин), когда присоединение дополнительной массы к электроду прекращается и кривая присоединения нативной ДНК выходит на плато. Полученная пленка обладает эластичными свойствами, о чем свидетельствует значение соотношения $\Delta R/\Delta F$, равное 0,183 Ом/Гц. Такая ДНК-содержащая пленка может быть использована в качестве чувствительного компонента пьезокварцевого сенсора, так как присоединение дополнительной массы к ее поверхности можно описать уравнением Зауэрбрея для эластичных пленок (Su, 2005).

Для изучения стабильности иммобилизованного комплекса поли-L-лизина с нативной и денатурированной ДНК через проточную ячейку, в течение длительного времени после образования комплекса, пропускали буфер и наблюдали за процессом десорбции. На рис. 8 показано, что денатурированная ДНК постепенно удаляется буфером с поверхности модифицированного поли-L-лизином электрода, тогда как нативная ДНК остается в связанном состоянии. Различия в характере связывания нативной и денатурированной ДНК можно объяснить следующим.

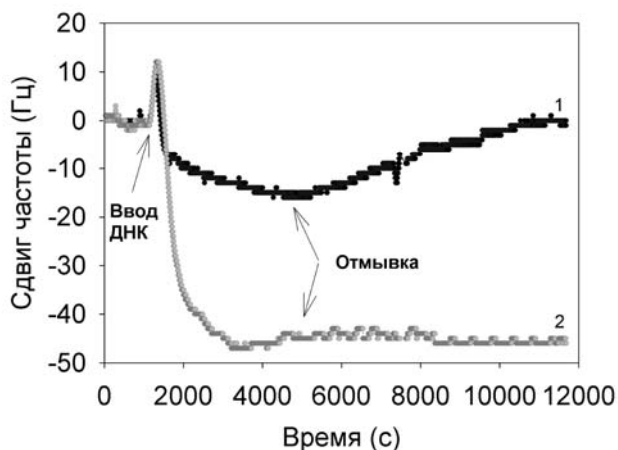


Рис. 8. Изменение частоты колебаний ПКР при длительной отмывке нанопленки, содержащей денатурированную ДНК (1) и нативную ДНК (2)

Принято считать, что при формировании комплексов нуклеиновых кислот полилизином связывание происходит за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и положительно заряженными δ -аминогруппами поли-L-лизина (Зенгер, 1987). Однако позднее было высказано предположение о том, что важную роль в процессе комплексообразования между поли-L-лизином и ДНК играет вторичная структура полинуклеотида (Niwa et al., 2002).

По нашим данным, денатурированная ДНК значительно менее эффективно связывается с поли-L-лизином, чем нативная ДНК. Очевидно, в основе связывания лежит исключительно электростатическое взаимодействие, поэтому при отмывке денатурированная ДНК легко удаляется с поверхности электрода. В случае комплекса поли-L-лизина с нативной ДНК электростатическое связывание дополняется конформационным взаимодействием, что обуславливает высокую стабильность комплекса и позволяет использовать его в качестве ДНК-содержащей нанопленки для конструирования ДНК-биосенсоров для определения АТ к нативной ДНК.

Важную роль во взаимодействии иммобилизованной нативной ДНК и АТ играет структура ДНК-содержащего чувствительного слоя. Для изучения структуры ДНК-содержащей пленки нами был применен метод атомно-силовой микроскопии. Результаты (табл. 1) показывают, что поли-L-лизин формирует нанопленку толщиной около 8,68 нм, что соответствует толщине мономолекулярного слоя на твердой поверхности (van den Beucken et al., 2006).

Таблица 1. Значения параметров перепада высот, среднеквадратичной шероховатости и толщины покрытия при поэтапном формировании ДНК-содержащей нанопленки

Пленка:	Параметр		
	перепада высот (нм):	среднеквадратичной шероховатости (нм):	толщина (нм):
золото	19,75±2,01	2,59±0,05	-
поли-L-лизин	28,43±4,68	3,19±0,31	8,68
ДНК	37,86 ±4,61	4,55±0,13	9,43

Нанесение нативной ДНК приводит к образованию ДНК-содержащей нанопленки, при этом толщина слоя ДНК составляет около 9,43 нм. Увеличение среднеквадратичной шероховатости свидетельствует о том, что молекула ДНК при взаимодействии с поли-L-лизином компактизуется в конденсированные формы различной морфологии.

АСМ – изображения нанопленок, полученные в режиме изучения топографии, представлены на рис. 9. Показано, что последовательное нанесение поли-L-лизина и нативной ДНК приводит к возникновению на поверхности электрода выпуклых областей и впадин между ними. Перепад высот для ДНК-содержащей нанопленки варьирует от 2 до 40 нм, что свидетельствует о развитой поверхностной структуре пленки. О неоднородности поверхности, полученной при иммобилизации ДНК, говорит и увеличение значения параметра шероховатости.

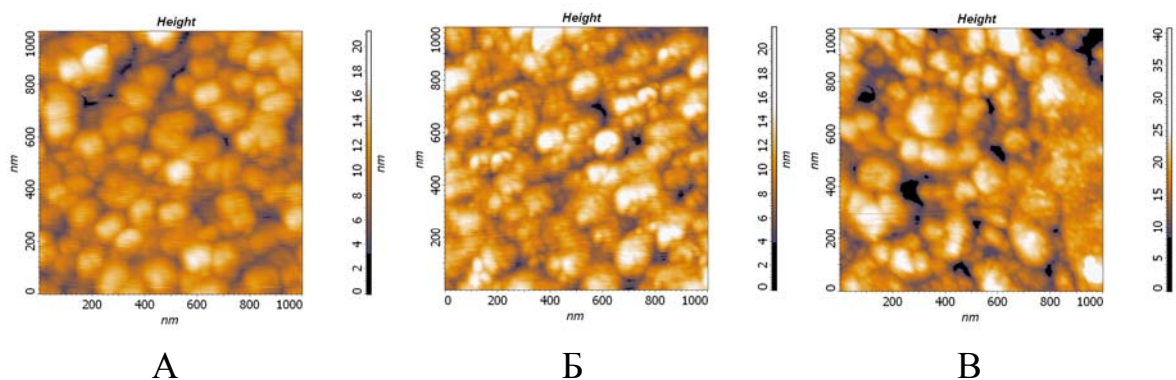


Рис. 9. АСМ-изображения (режим топографии): А – чистый золотой электрод; Б – золотой электрод, модифицированный поли-L-лизином; В – золотой электрод, модифицированный последовательно поли-L-лизином и ДНК

Изображения поверхностей чистых и модифицированных электродов, полученные в режиме фазового контраста (рис. 10) и отличающиеся высоким разрешением, дают наглядное представление о поэтапном

формировании в процессе самосборки и строения ДНК-содержащей нанопленки.

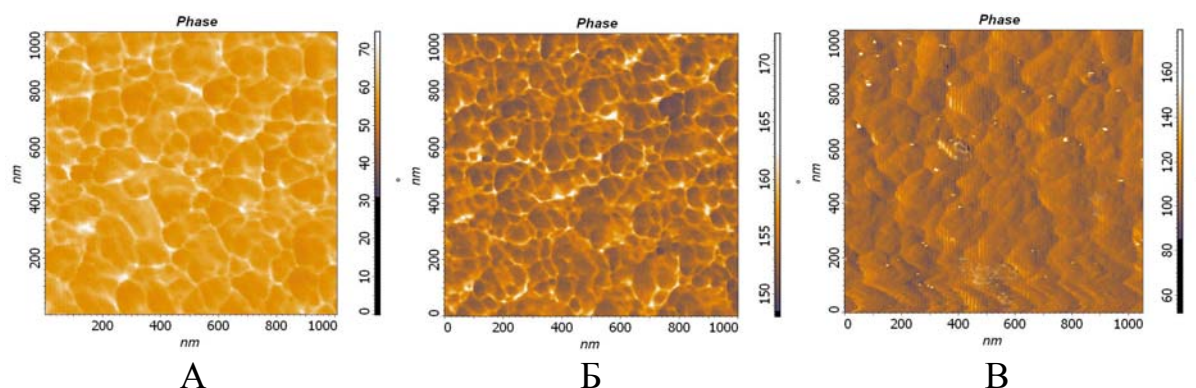


Рис. 10. АСМ-изображения (режим фазового контраста): А – чистый золотой электрод; Б – золотой электрод, модифицированный поли-L-лизином; В – золотой электрод, модифицированный последовательно поли-L-лизином и ДНК

Таким образом, иммобилизация поли-L-лизина на золотом электроде с последующим нанесением ДНК позволяет получить эластичную наноструктурированную ДНК-содержащую пленку, прочно закрепленную на поверхности биосенсора.

Применение пьезокварцевого биосенсора на основе ДНК-содержащей нанопленки для определения антител к нативной ДНК

Анализ в газовом режиме

Для оценки возможности обнаружения АТ к ДНК с помощью разработанного нами наногравиметрического ДНК-биосенсора в газовом режиме использовали образцы крови больных СКВ, отличающиеся по уровню содержания АТ к нДНК по данным иммуноферментного анализа (ИФА), приведенным в относительных единицах (отн. ед.). В качестве контроля использовали сыворотку крови здорового донора. Результаты показаны на рис. 11.

Сдвиг частоты колебаний биосенсора увеличивается с увеличением уровня содержания АТ к нДНК в исследуемых сыворотках. Полученные результаты показывают, что использование биосенсора в газовом режиме позволяет дифференцировать образцы сывороток крови больных СКВ по содержанию АТ к нДНК.

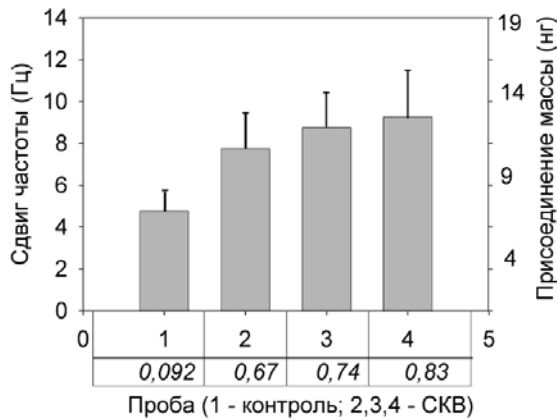
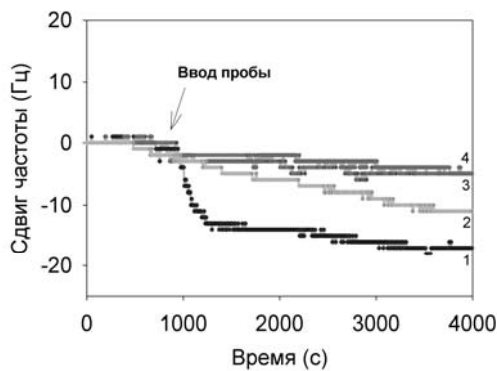


Рис. 11. Определение содержания АТ к ДНК в сыворотках крови здорового донора (1) и больных СКВ (2-4) в газовом режиме (под номерами проб указаны данные ИФА в отн. ед.)

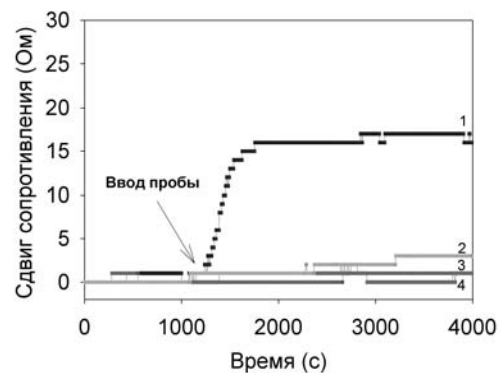
Анализ в жидкостном режиме

В отличие от газового режима, жидкостной (проточно-инжекционный) анализ дает возможность изучить процесс взаимодействия рецепторного слоя и определяемого вещества в динамике. Кроме того, отпадает необходимость в отмывке и высушивании биосенсора.

На первом этапе, для исключения влияния неспецифической сорбции, оценку чувствительности биосенсора в проточно-инжекционном режиме осуществляли, используя очищенные АТ к нДНК. В качестве контроля использовали АТ к дДНК, моноклональные IgG (анти-IgE человека) и ДНКазу I. Типичный отклик биосенсора показан на рис. 12.



А



Б

Рис 12. Отклик биосенсора при взаимодействии с очищенными АТ к нДНК (1), ДНКазой I (2), моноклональными IgG (анти-IgE человека) (3) и АТ к дДНК (4): А - ΔF ; Б - ΔR

Присоединение АТ к нДНК (линия 1) обуславливает резкое падение частоты колебаний и увеличение реактивного сопротивления биосенсора. Пропускание через проточную ячейку контрольных растворов, содержащих как моноклональные IgG (анти-IgE человека) (линия 3), так и АТ к дДНК (линия 4), вызывает лишь незначительный сдвиг частоты и сопротивления (табл. 2.), что исключает возможность неспецифического отклика в ходе анализа АТ к нДНК.

Таблица 2. Проточно-инжекционный иммуноанализ при взаимодействии с очищенными АТ к нДНК, АТ к дДНК, моноклональными IgG) и ДНКазой I

Образец:	IgG (анти-нДНК)	IgG (анти-дДНК)	Моноклональные IgG (анти-IgE)	ДНКазы I
ΔF (Гц):	18 ± 2	5 ± 1	4 ± 1	10 ± 1
ΔR (Ом):	17 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	3 ± 1
$\Delta R / \Delta F$ (Ом/Гц):	0,94	0,4	0,25	0,3

В отличие от контрольных IgG, взаимодействие ДНКазы I с чувствительным слоем биосенсора (линия 2) характеризуется поступательным падением частоты, что свидетельствует о присоединении фермента к ДНК. Однако, и величина сдвига частоты, и скорость присоединения ДНКазы I существенно отличаются от присоединения АТ к нДНК к ДНК-содержащей нанопленке. Соотношение $\Delta R / \Delta F$, наблюдаемое при присоединении АТ к нДНК к поверхности ДНК-содержащей нанопленки и равное 0,94 Ом/Гц (табл. 2), свидетельствует о вязкостно-эластичном характере сформированного слоя (Su, 2005), что принципиально отличается от эластичного присоединения ДНКазы I и неспецифических АТ. Полученные результаты позволяют предположить, что пьезокварцевый ДНК-биосенсор на основе ДНК-содержащей нанопленки может использоваться для изучения характера взаимодействия ДНК-связывающих белков с ДНК.

Разработка любого биосенсора направлена на определение анализируемого вещества не только в модельных растворах, но и в крови пациентов. В связи с этим нами изучена возможность применения ДНК-содержащей нанопленки в качестве чувствительного элемента биосенсора при проточно-инжекционном анализе образцов крови больных СКВ и здоровых доноров. Типичные кривые отклика биосенсора показаны на рис. 13.

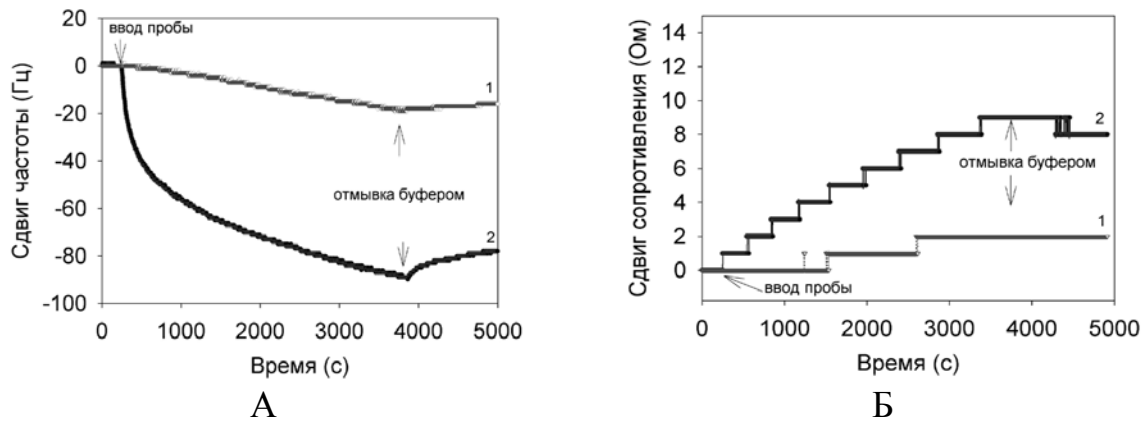


Рис. 13. Типичный отклик биосенсора при анализе сывороток крови больной СКВ (2) и здорового донора (1): А - ΔF ; Б - ΔR

Отклик при взаимодействии образца сыворотки, содержащей повышенный уровень АТ к нДНК (линия 2), с чувствительным покрытием биосенсора, существенно отличается от взаимодействия с образцом сыворотки крови здорового донора (линия 1). Дифференцировать специфическое взаимодействие АТ к нДНК от неспецифической сорбции компонентов контрольной сыворотки можно как по значениям сдвига частоты, так и по значениям сдвига сопротивления (табл. 3).

Таблица 3. Проточно-инжекционный иммуноанализ образцов крови больных СКВ и здоровых доноров

Образец:	СКВ	Здоровый донор
Данные ИФА (отн. ед.):	0,91	0,075
ΔF (Гц):	93 ± 6	14 ± 3
ΔR (Ом):	9 ± 1	2 ± 1

При этом одновременное измерение двух независимых параметров (частоты и сопротивления) обеспечивает высокую специфичность анализа.

Чувствительность разработанного биосенсора к уровню содержания АТ к нДНК в крови изучали с использованием сывороток крови больных бронхиальной астмой с известным содержанием АТ к нДНК. Типичные кривые отклика биосенсора при пропускании исследуемых образцов показаны на рис. 14.

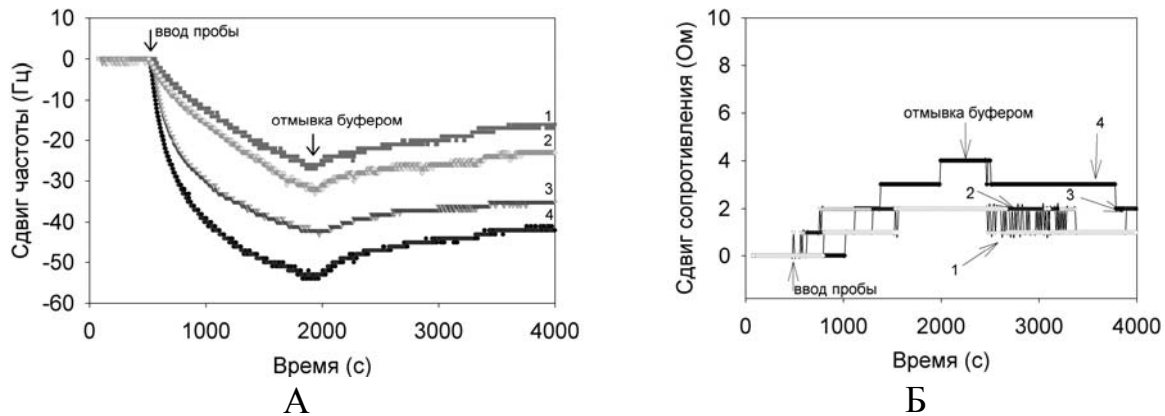


Рис. 14. Типичный отклик биосенсора при анализе сывороток крови человека, содержащих АТ к ДНК. Линии 1, 2, 3 – сыворотки больных бронхиальной астмой; 4 – сыворотка больной СКВ: А - ΔF ; Б - ΔR

После введения образцов сыворотки крови в проточную ячейку происходит падение частоты колебаний (рис. 15-А) и увеличение реактивного сопротивления (рис. 15-Б), пропорциональное содержанию АТ в образцах (табл. 4). Отмывка буфером приводит к удалению присоединившиеся неспецифических компонентов, при этом значения частоты и сопротивления выравниваются и в дальнейшем не изменяются.

Таблица 4. Проточно-инжекционный иммуноанализ сывороток крови больных бронхиальной астмой (БА) и СКВ, содержащих АТ к ДНК

Проба:	Астма 1	Астма 2	Астма 3	СКВ
Данные ИФА (отн. ед.):	0,33	0,62	0,87	1
ΔF (Гц):	22 ± 3	30 ± 1	43 ± 2	55 ± 2
ΔR (Ом):	1 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	4 ± 1

Полученные результаты свидетельствуют о стабильности присоединения АТ к ДНК-содержащей нанопленке.

Перспективы проведения экспресс-анализа с помощью пьезокварцевого ДНК-биосенсора

Нами выявлена зависимость скорости присоединения АТ к нДНК к биосенсору от уровня содержания АТ в анализируемом образце. Результаты показаны на рис. 15.

Изучение динамики присоединения АТ к нДНК в реальном времени показало, что осязаемый сигнал фиксируется прибором уже с первых минут введения образца, в отличие от методов иммуноферментного или газового наногравиметрического анализа, предполагающих длительные стадии инкубации.

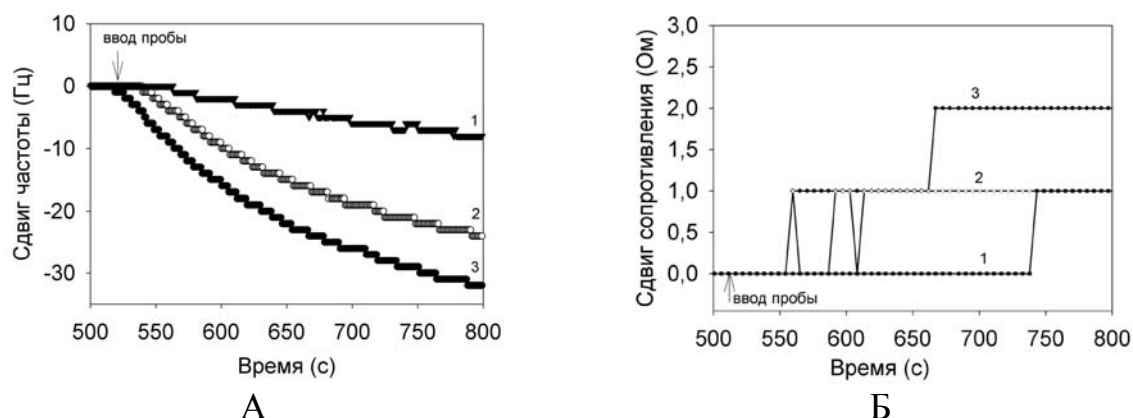


Рис. 15. Экспресс-анализ АТ к нДНК в образцах сывороток больных бронхиальной астмой (1,2) и СКВ (3) А - ΔF ; Б - ΔR . Содержание АТ к нДНК: 0,2; 0,8 и 1 отн. ед., соответственно

Мы предполагаем, что разработанный нами биосенсор на основе ДНК-содержащей нанопленки, может быть использован в проточно-инжекционном режиме для экспресс-анализа АТ к нДНК.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что поли-L-лизин может быть использован в качестве предшественника для иммобилизации нативной ДНК на поверхности золотых и серебряных электродов пьезокварцевых резонаторов.
2. Определены условия формирования поли-L-лизинового слоя-предшественника на электроде пьезокварцевого резонатора, изучена зависимость формирования пленки от материала электродов.
3. Оптимизированы условия формирования ДНК-содержащей нанопленки. Методами наногравиметрического анализа и атомно-силовой микроскопии определены кинетика формирования, вязкостно-эластичные свойства и структура ДНК-содержащей нанопленки.
4. Разработан пьезокварцевый биосенсор на основе ДНК-содержащей нанопленки и показана возможность его применения для определения антител к нативной ДНК в сыворотке крови.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Коновалова О.А. Перспективы создания ДНК-модифицированных иммуносенсоров на основе пьезоэлектрических и электрохимических трансдьюсеров / О.А. Коновалова, **Р.Ф. Фахруллин**, В.Г. Винтер // VI Международная научная молодежная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия». Сборник статей. – Казань. 2002. – С.342-348.

2. **Фахруллин Р.Ф.** ДНК-модифицированный наносенсор на основе пьезоэлектрического кварцевого резонатора / **Р.Ф. Фахруллин**, К.Ю. Нагулин, О.А. Коновалова, Ф.Ф. Мухлисуллина, В.Г. Винтер // VII Международная научная молодежная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия». Сборник статей. – Казань. 2003. – С.215-221.
3. Салахов М.Х. Микрогравиметрические биосенсоры на основе пьезокварцевых резонаторов / М.Х. Салахов, В.Г. Винтер, О.А. Коновалова, **Р.Ф. Фахруллин** // «Новая Геометрия Природы»: Труды объединенной международной научной конференции. Т II: Биология, медицина. – Казань. 2003. – С.318-324.
4. Коновалова О.А. Возможности использования ДНК-модифицированного пьезоэлектрического биосенсора для определения АТ к ДНК / О.А. Коновалова, **Р.Ф. Фахруллин**, В.Г. Винтер // «Новые биокibernетические и телемедицинские технологии 21 века для диагностики и лечения заболеваний человека». Тезисы докладов второй междисциплинарной конференции, посвященной 300-летию г. Петрозаводска. – Петрозаводск. 2003. – С.55-56.
5. **Фахруллин Р.Ф.** Изучение сорбции биологического чувствительного слоя на поверхности электродов пьезокварцевого наносенсора / **Р.Ф. Фахруллин**, О.А. Коновалова, К.Ю. Нагулин, В.Г. Винтер // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы научно-практической конференции. Казань, 17-18 июня 2004 г. Труды молодых ученых, под ред. Р.Г. Василовой. – М.: «Русская панорама», 2004. – С.138-143.
6. **Фахруллин Р.Ф.** Применение пьезокварцевого наносенсора для определения ДНК-интеркалирующих соединений / **Р.Ф. Фахруллин**, О.А. Коновалова, Ф.Ф. Мухлисуллина, К.Ю. Нагулин, В.Г. Винтер // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы научно-практической конференции. Казань, 17-18 июня 2004 г. Труды молодых ученых, под ред. Р.Г. Василовой. – М.: «Русская панорама», 2004. – С.143-148.
7. **Фахруллин Р.Ф.** Изучение сорбции биологического чувствительного слоя на поверхности электродов пьезокварцевого наносенсора / **Р.Ф. Фахруллин**, О.А. Коновалова, К.Ю. Нагулин, В.Г. Винтер // VIII Международная научная молодежная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия». Сборник статей. – Казань. 2004. – С.239-245.
8. **Фахруллин Р.Ф.** Применение пьезокварцевого наносенсора для определения ДНК-интеркалирующих соединений / **Р.Ф. Фахруллин**, О.А. Коновалова, Ф.Ф. Мухлисуллина, К.Ю. Нагулин, В.Г. Винтер // VIII Международная научная молодежная школа «Когерентная оптика и оптическая спектроскопия». Сборник статей. – Казань. 2004. – С.245-251.
9. Винтер В.Г. Создание ДНК-наносенсоров на основе пьезокварцевых резонаторов / В.Г. Винтер, О.А. Коновалова, **Р.Ф. Фахруллин**, В.В. Чижов,

- С.С. Харинцев, М.Х. Салахов // Научные технологии. – 2004. – №4. – Т. 5. – С. 24-30.
10. **Фахруллин Р.Ф.** Иммобилизация покрытий и контроль чувствительных слоев пьезокварцевого наносенсора / **Р.Ф. Фахруллин**, К.Ю. Нагулин, О.А. Коновалова, Л.И. Анчикова, Е.Ю. Подшивалина // «Аналитика России – 2004» (Всероссийская конференция по аналитической химии). – Москва. – 2004. Тезисы докладов. – С.103.
 11. **Fakhrullin R.F.** The development of DNA-nanosensors based on piezoelectric resonators / **R.F. Fakhrullin**, S.S. Kharintsev, O.A. Konovalova, M.Kh. Salakhov, V.G. Vinter // Problems of nonlinear analysis in engineering systems. – 2005. – V. 2 (23) – P. 37 – 48.
 12. **Фахруллин Р.Ф.** Кварцевый наногравиметрический анализатор как инструмент для изучения межмолекулярного взаимодействия ДНК и поли-L-лизина / **Р.Ф. Фахруллин**, М.В. Матвеева // Материалы VI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века". – Казань. 2006. Тезисы докладов. – С.114.
 13. **Фахруллин Р.Ф.** Определение оптимальных условий формирования полилизинной пленки для иммобилизации ДНК на поверхности электродов пьезокварцевых резонаторов / **Р.Ф. Фахруллин**, О.А. Коновалова, В.Г. Винтер, М.Х. Салахов // Сборник материалов 10-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", – Пущино. 2006. – С. 170.
 14. **Фахруллин Р.Ф.** Определение АТ к ДНК в сыворотке крови иммунизированных кроликов / **Р.Ф. Фахруллин**, Е.Ю. Подшивалина, О.А. Коновалова, Л.И. Анчикова, К.Ю. Нагулин, З.И. Абрамова, М.Х. Салахов // Структура и динамика молекулярных систем. Сборник тезисов докладов и сообщений на XIII Всероссийской конференции. – Уфа. 2006. – С.257
 15. **Фахруллин Р.Ф.** Наногравиметрический ДНК-биосенсор: формирование биорецепторной пленки и определение АТ к ДНК / **Р.Ф. Фахруллин**, В.Г. Винтер, З.И. Абрамова, Л. И. Анчикова, Е.Ю. Подшивалина, О.А. Коновалова, К.Ю. Нагулин, М.Х. Салахов // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2006. - № 8-9 (Принято в печать).
 16. **Фахруллин Р.Ф.** Изучение межмолекулярного взаимодействия ДНК и полилизина методами наногравиметрического анализа и атомно-силовой микроскопии / **Р.Ф. Фахруллин**, З.И. Абрамова, О.А. Коновалова, М.Х. Салахов // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2006. – Т. 148. Серия «Естественные науки», книга 3. (Принято в печать).